

人類三分之一食物靠蜜蜂！ 破解蜜蜂病毒—保護蜂群急先鋒

陳俊榮 研究員 / 教授、陳乃齊 博士
國家同步輻射研究中心 生命科學小組



國家同步輻射研究中心生命科學小組陳俊榮研究員 / 教授（後排左二）、博士級研究人員陳乃齊博士（後排右二）與其實驗室研究團隊。

「若蜜蜂從地表消失，人類活不過四年。」這句話說明了蜜蜂和人類生活息息相關。從香甜的蜂蜜、到蔬果穀物、再到以草料為食糧的家畜，一切皆靠蜜蜂授粉才得以存在，牠們在維護生物多樣性和永續環境、農業發展一直扮演至關重要的角色。而臺灣屬於熱帶 / 亞熱帶氣候，為蜜蜂提供棲息和繁殖的場所及多樣化花蜜來源。因此為了維護全球生態環境和發展農業與經濟，保護蜜蜂族群是一非常重要的課題。

目前全球有兩個主要和經濟性相關的重要蜜蜂物種—東方蜜蜂 (*Apis cerana* Fabricius) 和西方蜜蜂 (*Apis mellifera* Linnaeus) [1]。東方蜜蜂原產於亞洲，是許多農作物如水稻和蘭花的重要授粉者，以能在熱帶地區極端高溫 and 潮溼環境中生存而聞名。而西方蜜蜂也是世界上最重要的傳粉者之一，體型較東方蜜蜂大，產蜜量高，是一般用於蜂蜜生產的主要品種。

根據聯合國糧食及農業組織資料顯示，全球有近三分之一的農作物種植仰賴蜜蜂授粉。然而過去數十年來，世界各地蜜蜂數量逐年驟減，無法幫農作物正常授粉，直接影響到人類糧食危機。蜂群常於短時間神秘失蹤滅亡，一直是科學界的一大謎團，美國於 2006 年將此現象命名為「蜂群崩壞症候群」(Colony Collapse Disorder)[2]。除了人為因素與

環境變遷之外，調查發現另一個非常重要的原因是受到含 RNA 病毒感染而引起 [2]，主要透過接觸已受感染的蜜蜂或攜帶病毒的寄生蟎蟲而傳播給蜂群。蜜蜂一旦被病毒感染後主要症狀為體型變小、尾部呈黑色、斑紋不清晰、體毛消失、行動不協調等。其腦部與中樞神經，甚或翅膀會遭受傷害，影響牠們採集食物或尋路回巢的能力。絕大部分的離巢工蜂都在遠處衰亡，蜂巢中僅剩年輕保育蜂與蜂王。而少數返巢的受感染工蜂，也因再次汙染棲息地，造成剩餘的蜜蜂死亡。

病毒是最小、最簡單但卻奇妙的微生物，為了生存與繁衍，可感染各種宿主，包括人類、動物、植物，甚至細菌。其 DNA 或 RNA 基因被包裝在蛋白質球殼中，當病毒感染宿主細胞時，可進行複製並感染其他細胞。病毒外殼構造由其組成及蛋白質數量與排列方式決定，主要分兩種類型：套膜病毒 (enveloped viruses) 和無套膜病毒 (non-enveloped viruses)。套膜病毒有一層磷脂雙層和蛋白質組成的保護層，如新冠病毒。而無套膜病毒，僅由殼體蛋白質 (capsid protein, CP) 組成，如石斑魚神經壞死病毒 [3]、蝦白尾症病毒 [4]。病毒殼體結構和功能的研究是一快速發展的重要領域，可幫助我們瞭解病毒如何感染細胞和致病，也為開發抗病毒藥物和疫苗奠定基礎。

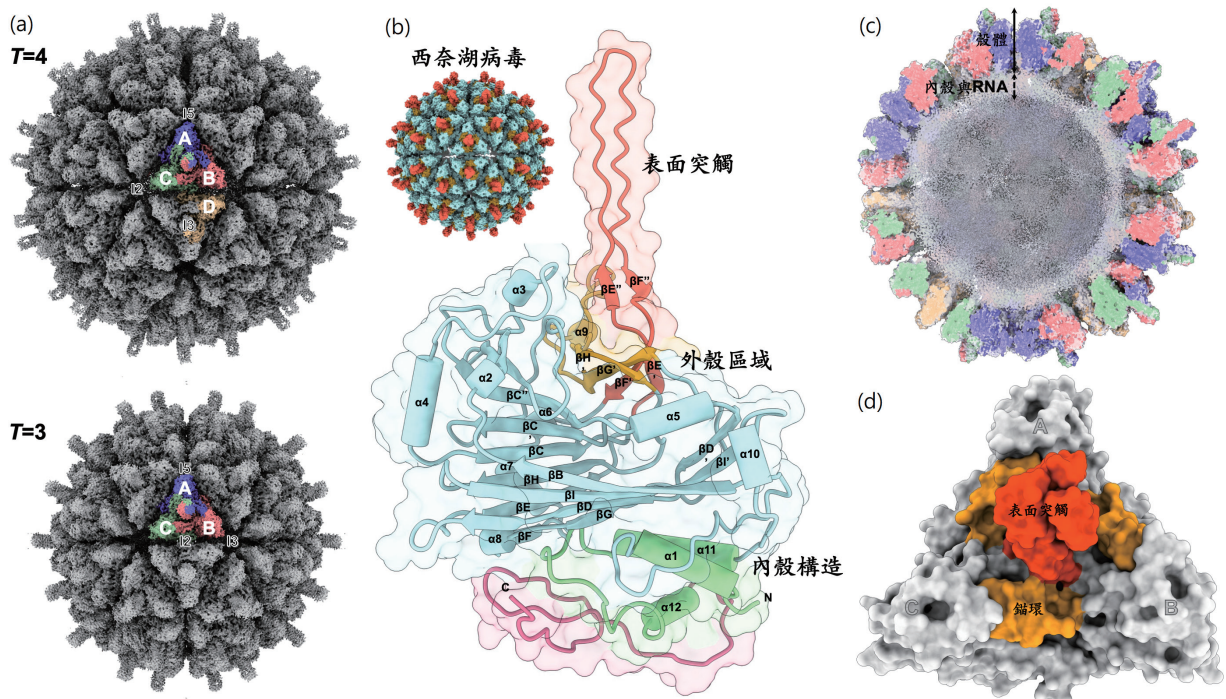
西奈湖病毒 (Lake Sinai virus, LSV) 是一無套膜 RNA 病毒，極具傳染力。首次發現於 2009 年在美國南達科他州的西奈湖 (Lake Sinai) 附近的商業性外來種養蜂場，從受感染的蜜蜂腸道中所萃取分離出來。透過基因定序，被歸類為一新種病毒，並將之命名為西奈湖病毒。在 2012 年後此病毒很快透過蜂群養殖的商業管道傳播至全世界，短時間內就成為當地感染蜜蜂病毒種類中的最大宗，且盛行率最高。嚴重導致全世界蜜蜂高死亡率和蜂群崩壞症候群，於各國都有發現此病毒的存在，引起了歐美亞洲等各國的重視與研究，並可分為八種類型。

我們運用國輻中心與日本春八 (SPring-8) 的高強度 X 光實驗站—TPS 05A、TPS 07A、SP44XU「X 光蛋白質結晶學」(X-ray protein crystallography, PX) 與 TPS 13A「小角度 X 光散射」(small-angle X-ray scattering, SAXS)，結合美國史丹福大學 SLAC 國家加速器實驗室 (SLAC National Accelerator Laboratory) 與中研院的「冷凍電子顯微鏡」(cryo-electron microscopy, cryo-EM)，對西奈湖蜜蜂病毒的殼體蛋白結構進行分析，解析度高達 0.25 奈米 (2.5 Å)，首度一窺該病毒的廬山真面目 (圖一) [5]。

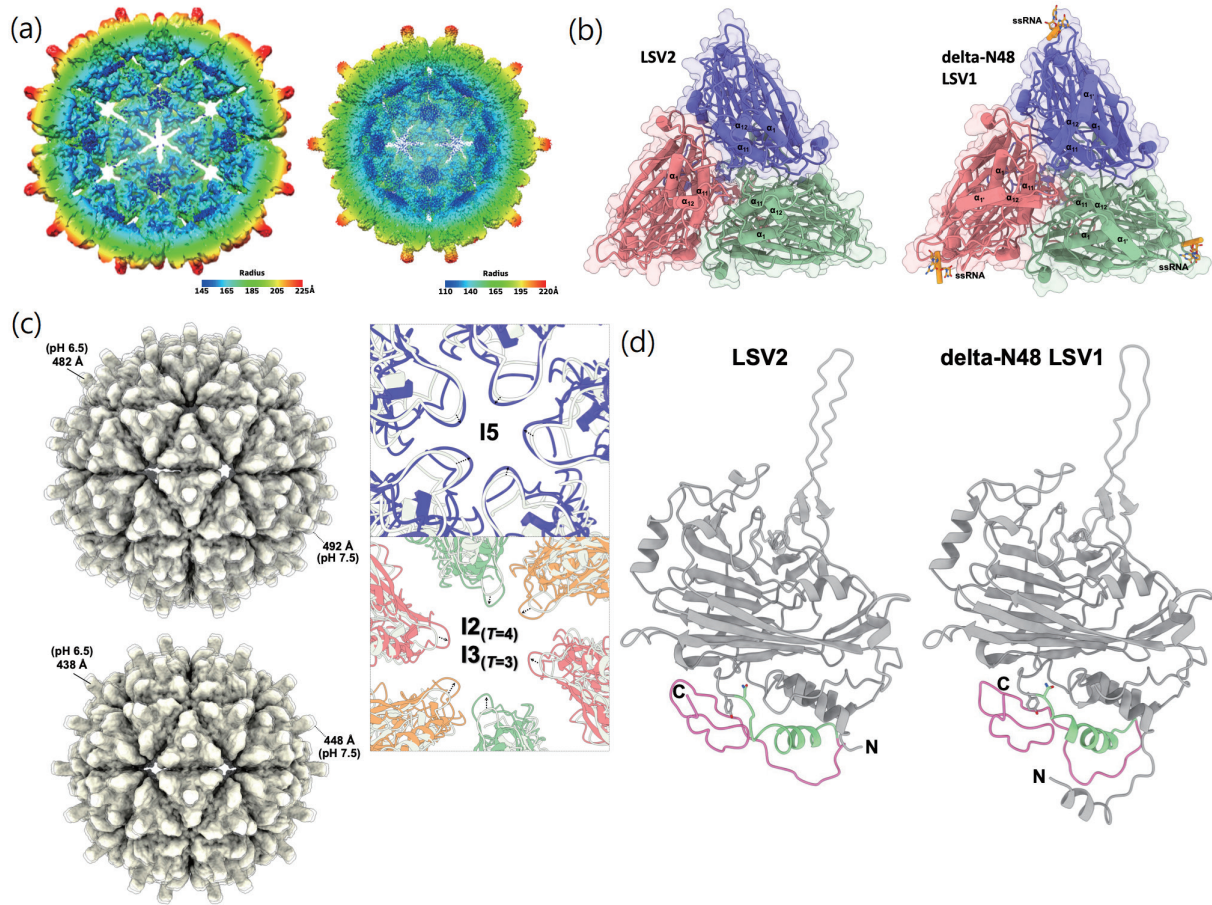
研究病毒結構，關鍵之一是取得大量高均質的病毒蛋白質。我們設計合成病毒蛋白質對應之基因，透過大腸桿菌 (*E. coli*) 來大量表現蛋白質，再純化出西奈湖病毒殼體蛋白質，緊接於體外模擬生理環境讓殼體蛋白質自行組裝成類病毒顆

粒 (virus-like particles, VLPs) [圖一 (a)]。類病毒顆粒內部不含病基因，無傳染力，但外觀結構與真實病毒相同。我們發現西奈湖病毒第二型類病毒 (LSV2 VLPs) 的冷凍電鏡結構同時具有 $T=4$ 和 $T=3$ 顆粒大小不同之多態性， $T=4$ 和 $T=3$ 第二型類病毒之直徑分別約為 492 和 448 Å，內直徑約 294 和 250 Å，且蛋白殼層厚度約 100 Å。正二十面體 (icosahedral) 的 $T=4$ 第二型類病毒是由 240 個相同殼體蛋白組成的中空球型殼體，表面有 80 個明顯平均分佈的三聚體尖峰 (spike)，殼體中 60 個非對稱單位各含有四個次單元蛋白 (紫、綠、粉及黃色)。而 $T=3$ 第二型類病毒則是由 180 個外鞘蛋白質組成，表面具有 60 個三聚體尖峰，殼體中 60 個非對稱單位各含三個次單元蛋白 (紫、綠及粉色)。所有類病毒球體內皆包覆著部分單股 RNA (single-stranded RNA, ssRNA)，推估是病毒蛋白在組裝成病毒類顆粒時結合了部分的大腸桿菌 RNA。

單一殼體蛋白可依其主要功能分為「表面突觸」(surface protruding domain)、「外殼區域」(shell domain) 和「內殼構造」(inner shell domain) 等區域 [圖一 (b)]。表面突觸像一把鑰匙，用來連結並打開蜜蜂宿主細胞大門，讓病毒 RNA 侵入宿主；外殼區域則負責球型殼體的組裝與鞏固；內殼構造可藉由結合 RNA 來完成病毒的複製與組裝 [圖一 (c)]。外殼區域結構具有一個獨特的錨環 (anchor loop)，其延伸結構橫跨相鄰次單元蛋白，具有維持三聚體的穩定性功能，而當將此錨環刪除後，會造成西奈湖病毒組裝效率大幅降低 [圖一 (d)]。



圖一 西奈湖病毒第二型類病毒結構：(a) $T=4$ 和 $T=3$ 第二型類病毒冷凍電子顯微鏡結構；(b) 第二型類病毒之單一殼體蛋白結構；(c) 第二型類病毒之內殼結構與 RNA 結合區域；(d) 第二型類病毒之錨環結構可穩定三聚體。



圖二 西奈湖病毒第一型類病毒與相關殼體變化及剪切機制：(a) $T=4$ 和 $T=3$ 西奈湖病毒第一型無 N48 類病毒；(b) 西奈湖病毒第一型無 N48 類病毒與第二型之殼體蛋白三聚體比較；(c) 第二型類病毒之殼體動態變化；(d) 西奈湖病毒維持殼體蛋白質 C 端完整性（綠色及桃紅色），無自我剪切機制；桿狀標示為突變後的氨基酸切位點。

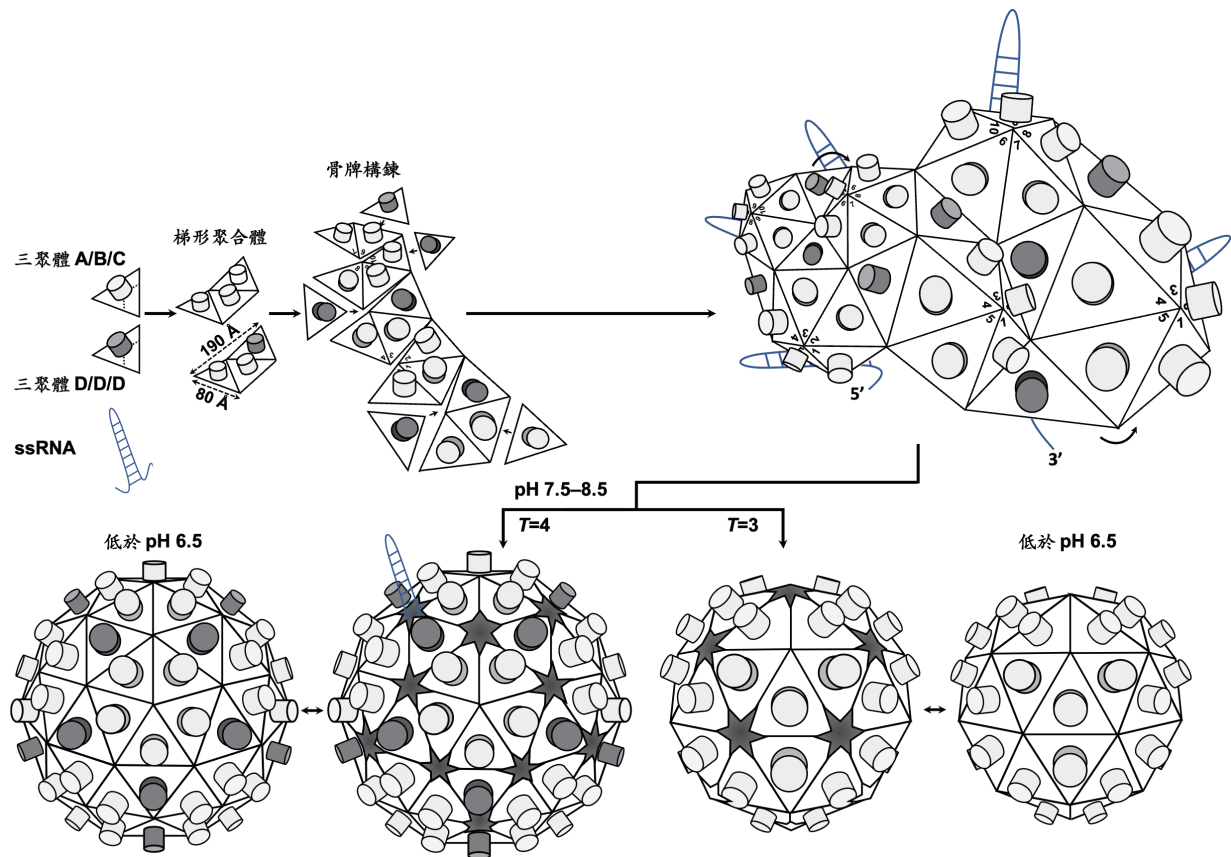
西奈湖病毒第一型與第二型殼體蛋白的主要差別是第一型的氨基酸序列 N 端具有額外 48 個氨基酸。為了研究比較，我們截斷了第一型 N 端 48 個氨基酸（N48），將之稱為西奈湖病毒第一型無 N48 殼體蛋白（delta-N48 LSV1 CP），並組裝成西奈湖病毒第一型無 N48 類病毒（delta-N48 LSV1 VLPs）。第一型無 N48 類病毒也具有與第二型相似之 $T=4$ 和 $T=3$ 顆粒大小之結構多型性〔圖二 (a)〕。於第一型無 N48 外鞘蛋白，位於內殼構造表面的螺旋體 $\alpha 1'$ (helix $\alpha 1'$)、 $\alpha 1'$ - $\alpha 1$ 連接環 ($\alpha 1'$ - $\alpha 1$ loop) 和 C 端含有大量帶正電氨基酸，於病毒組裝過程中，呈現類似魔鬼氈與 ssRNA 結合作用，促進 ssRNA 吸附在內殼構造表面〔圖二 (b)〕。

此外，經由對比西奈湖病毒第二型類病毒的冷凍電鏡、小角度 X 光散射以及 X 光晶體之動態與靜態結構，發現在不同的 pH 環境下 (pH 8.5 vs. 7.5 vs. 6.5)，病毒顆粒在中、鹼性下會呈擴張現象，而在酸性下會呈現較緊縮狀態〔圖二 (c) 左〕，且與正二十面體之二或三軸對稱的開孔直徑大小有直接相關性〔圖二 (c) 右〕。而西奈湖病毒第二型類病毒上二或三軸對稱開孔處比五軸對稱開孔處更加動態和

多變。我們也發現病毒顆粒的擴張及緊縮是一隨著 pH 環境的可調性、可逆性動態行為 (dynamic particle motion)，這在西奈湖病毒的成熟化以及於宿主細胞內侵入、感染和複製上扮演關鍵作用。

一些病毒殼體蛋白會因應不同生理環境下，進行蛋白自我剪切 (autoproteolysis)，使病毒成熟化。我們發現西奈湖病毒第二型與第一型無 N48 類病毒皆無自我剪切現象，且維持殼體蛋白完整性〔圖二 (d)〕，顯示西奈湖病毒並非利用自我剪切進行成熟化。然而，在比對西奈湖病毒第二型病毒與其他會自我裁切的病毒之氨基酸序列，並參考結構的相對位置，我們將數個對應氨基酸進行突變，以模擬自我剪切的條件，發現突變的殼體蛋白 C 端可具有自我剪切能力。我們利用質譜技術 (MALDI TOF mass spectroscopy) 來檢視確認切位點，有助於瞭解病毒自我剪切的機制。

我們也首次觀察到病毒組裝過程的過渡形態，在冷凍電鏡影像中，除了病毒顆粒外也有許多不同長度的骨牌構鍊以及病毒顆粒半成品。推測病毒殼體形成初期是由殼體蛋白質「三聚體」(homo-trimeric capsomeres) 為主要單元



圖三 西奈湖病毒顆粒組裝過程與受 pH 調控的動態行為。

(點)，之後相互連結成不同長度的骨牌構鍊 (linear domino-scaffold) (線)，再像球型拼圖一樣組裝成完整殼體 (sphere architecture) (面) (圖三)。

我們所開發的類病毒顆粒，除了可模擬真實病毒，也避免研究病毒時的風險。類病毒顆粒可應用於生物載體，運送相關物質或藥物到所需地點再釋放。病毒殼體研究另一新進展為利用「模組化類病毒平台」(modular capsid virus-like vaccine platform) [6]，開發新的抗病毒藥物和疫苗。模組化類病毒是指被設計成具有新特性的套膜或殼體蛋白，可直接向受感染的細胞提供抗病毒藥物，或是產生更有效預防感染的疫苗。

目前尚無特定方法或藥物對抗西奈湖蜜蜂病毒，現行控制疫情的方式，除了大規模燒毀染疫蜂巢或區域隔離來避免接觸受感染的蜜蜂，但此法將造成養蜂業的重大損失；另一方法是用殺蟲劑撲殺染疫蜂群與寄生蟎蟲，卻會破壞環境，也讓蜂蜜受化學汙染，延伸食安問題。現階段已知一些植物或真菌萃取物具抗病毒活性，可以被利用來提高蜜蜂存活率。破解嶄新的西奈湖蜜蜂病毒結構與感染機制，對於抗蜜蜂病毒天然藥物開發具有非常重要意義。未來我們希望能以病毒結構為基礎來尋找適當的天然萃取物，開發專一性新型抗病毒藥物，混於食物中餵食，以提高蜜蜂的抗病毒能力。

對蜂群健康獲得重要的防護效果，將有助解決養蜂業的困境，也為農業帶來新契機。讓蜜蜂與病毒共處，保持自然界的生物多樣性。

參考文獻：

1. M. V. Srinivasan, *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 267 (2010).
2. D. L. Cox-Foster, S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P. Quan, T. Briese, M. Hornig, D. M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A. L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S. K. Hutchison, J. F. Simons, M. Egholm, J. S. Pettis, W. I. Lipkin, *Science*, **318**, 283 (2007).
3. N. C. Chen, M. Yoshimura, H. H. Guan, T. Y. Wang, Y. Misumi, C. C. Lin, P. Chuankhayan, S. I. Chan, T. Tsukihara, T. Y. Chen, C. J. Chen, *PLoS Pathog.* **11**, e1005203 (2015).
4. N. C. Chen, M. Yoshimura, N. Miyazaki, H. H. Guan, P. Chuankhayan, C. C. Lin, S. K. Chen, P. J. Lin, Y. C. Huang, K. Iwasaki, A. Nakagawa, S. I. Chan, C. J. Chen, *Commun. Biol.* **2**, 72 (2019).
5. N. C. Chen, C. H. Wang, M. Yoshimura, Y. Q. Yeh, H. H. Guan, P. Chuankhayan, C. C. Lin, P. J. Lin, Y. C. Huang, S. Wakatsuki, M. C. Ho, C. J. Chen, *Nat. Commun.* **14**, 545 (2023).
6. L. H. Lua, N. K. Connors, F. Sainsbury, Y. P. Chuan, N. Wibowo, A. P. Middelberg, *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 425 (2014).